

Translation of portions of JP-2-16994

The invention relates to a novel cell proliferation inhibiting factor which comprises a single-stranded polypeptide having 45,000 molecular weight and having also about 4.7 isoelectric point (pI), unstable to acids and stable to reducing agents.

The invention relates also to a method of manufacturing the novel cell proliferation inhibiting factor, characterized by the steps of culturing an animal tumorous transformant cell and separating and purifying the factor from the resultant culture solution.

The tumorous transformant cell (RSV BRL: FERM-1970) which produces the novel cell proliferation inhibiting factor of the invention is obtained by transforming a liver cell strain of normal rat origin with Rous sarcoma virus and that this factor is expected to be useful as a carcinostatic agent.

This cell growth inhibiting factor of the invention is obtained by transforming, by a standard procedure, liver cell strain of normal rat origin with Rous sarcoma virus and selecting from a number of resultant tumorous transformant cell strains.

In this invention, RSV- BRL (FERM BP-1907) can be cited as a cell strain capable of efficiently producing the novel cell growth inhibiting factor of the invention. More particularly, the RSV BRL cells are cultured in a serum-free culture medium and the cells are removed from the culture medium by e.g. centrifugal separation and then subjected to salting out with e.g. ammonium sulfate to collect the proteins contained in the medium. Then, the proteins are suspended in a phosphoric acid buffered physiological saline solution (PBS), dialyzed and centrifuged to collect a supernatant. This supernatant is subjected to the separation and purification by the five kinds of column chromatography, whereby the invention's cell growth inhibiting factor can be obtained.

The invention's cell growth inhibiting factor has a molecular weight of about 45,000. This molecular weight was determined by SDS (sodium dodecyl sulfate) -PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). The invention's cell growth inhibiting factor is deactivated by either being in contact with 0.1 M acetic acid for 24 hours or heated at 100°C for 5 minutes or at 60°C for 30 minutes. However, this factor is stable to reducing agents such as 50 mM dithiothreitol and this factor comprises a single-stranded polypeptide.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-16994

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月19日

C 12 P 21/00
C 07 K 15/06
A 61 K 37/02
C 07 K 3/02
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

ADU

A

6712-4B
8318-4H
8615-4C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

⑯ 発明の名称 細胞増殖阻害因子及びその製造方法

⑰ 特 願 昭63-165820

⑱ 出 願 昭63(1988)7月5日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月30日、株式会社蟹巻房内BIOTHERAPY発行の
「BIOTHERAPY第2巻第2号」に発表

⑲ 発 明 者 宮 崎 香 大阪府箕面市栗生関谷西1丁目6番7-308号
⑲ 発 明 者 高 久 春 雄 大阪府吹田市古江台5丁目3-D 20-305
⑳ 出 願 人 日本製薬株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号
㉑ 代 理 人 弁理士 戸田 親男

明 願 書

1. 発明の名称

細胞増殖阻害因子及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 分子量約45,000、等電点(pI)約4.7で、かつ酸に不安定で還元剤に安定な一本鎖のポリペプチドからなる新規細胞増殖阻害因子。

(2) 動物の腫瘍性形質転換細胞株を培養し、培養液から分離精製することと特徴とする新規な請求項(1)の細胞増殖阻害因子の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、動物の腫瘍性形質転換細胞株を培養した培養液中から分離される新規な細胞増殖阻害因子に関する。

本発明の細胞増殖阻害因子は、ヒト細胞株にたいして増殖阻害性を示し、制癌剤として有用である。

(従来技術)

一般に、生体内の細胞増殖制御機構においては、

増殖因子(Growth Factor)と増殖阻害因子(Growth Inhibitor)が相反な役割を担っていると考えられている。

最近、種々の組織に増殖阻害因子が存在することが知られ、その生物学的な意義が認められるようになってきた。このような増殖阻害因子の一つとして、A型トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)が知られている。

また、本発明者は、先に、ラットおよびヒトの血液における細胞増殖阻害因子の研究中に、ヒトの血小板中に分子量約27,000で、還元により失活し、2個のサブユニットからなる上皮細胞増殖阻害因子が存在することを見出した(特願昭63-25523号公報)。

(発明が解決する問題点及び手段)

本発明者らは、上記研究をさらに進めた結果、正腎ラット由来の肝細胞株をラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)で形質転換した腫瘍性形質転換細胞(RSV-BRL)自身が、培養液中に2種の増殖阻害因子を分泌することを見出した。このうち

特開平 2-16994(2)

の一型は、TGF- β 誘阻因子である可能性が高いが、他の一型は、明らかに新規な細胞増殖阻害因子であることを見出した。

本発明は、この知見に基づきなされたもので、本発明の新規な細胞増殖阻害因子は有用な阻害剤として用いられるものである。

本発明の新規な細胞増殖阻害因子を産生する腫瘍性形質転換細胞は、RSV-BRLとしてPBRM DP-1807で做工研に寄託されている。

本発明は、分子量約45,000、等電点(pI)約4.7で、かつ、酸に不安定で還元剤に安定な一本鎖のポリペプチドからなる新規細胞増殖阻害因子に関するものである。

また、本発明は動物の腫瘍性形質転換細胞株を培養し、培養液中から分離精製することと特徴とする新規な上記細胞増殖阻害因子の製造方法に関する。

本発明の新規な細胞増殖阻害因子を産生する腫瘍性形質転換細胞(RSV-BRL細胞)は、正常ラット由来の肝細胞株にラウス肉腫ウイルスを加え、常法

により形質転換し、得られた多くの腫瘍性形質転換細胞株から選別して、取得することができる。

本発明においては、新規細胞増殖阻害因子をよく生産する細胞株としてRSV-BRL(FBRM DP-1807)を代表細胞株として示すことができる。

上記本発明の細胞増殖阻害因子は、例えば、次の方法で得ることができる。

前述した RSV-BRL細胞を無血清培地で培養した細胞を集め、遠心分離等の手段で細胞を除き、硫酸アンモニウム等により塩析し、培地中に含まれるタンパク質を回収する。次いで、このタンパク質を精製緩衝生理食塩水(PBS)に溶解して透析を行い、遠心分離して上清を集め、これを5%のカラムクロマトグラフィーで分離精製することにより、本発明の細胞増殖阻害因子を得ることができる。

本発明の細胞増殖阻害因子は分子量約45,000であるが、この分子量はSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定されたものである。また、本発明の細胞増殖阻

- 3 -

害因子は、0.1%の酢酸に24時間接触させたり、100℃で5分間煮たりは60℃で30分間加熱することにより失活するが、50mMのジチオスレイトールなどの還元剤に対しては安定であり、一本鎖のポリペプチドからなるものである。

【実施例】

コンディショニングメディアの調製

RSV-BRL-1細胞(FBRM DP-1807)をDMEMとF12の等量混合培地(DME/F12)にさらに牛胎児血清を最終濃度10%になるように添加した培地25mlを含む直径150mmのシャーレに播き、細胞が致石状(confluent)になるまで培養した。次に、培養液を捨て、細胞が剥がれないようにしてPBSで2回洗浄した。次いで、無血清培地(DME/F12)を25ml入れ、5時間インキュベートした後、培養液を捨ててシャーレ及び細胞表面に血清が残らないようにした。これに、前記と同様の新しい無血清培地25mlを入れ2日間培養し、この培養液を集め、また、新しい前述の培地に置き、2日間培養を行い培養液を集めた。この操作を細胞が剥がって停止するまで

- 4 -

(5~6回)行った。

上記のようにして集めた培養液を遠心分離して細胞を除いた後、85%飽和硫酸の硫酸アンモニウムで塩析し、RSV-BRL細胞が培養液中に分泌したタンパク質を回収した。このタンパク質を少量のPBSに溶解し、PBSに対して、4℃で24時間透析を行った。透析後、遠心分離を行い、上清を集めた。

精製

(1) 上記で得られた上清を、セルロフライン(Celulofine)GCL-2000m(チッソ(株)社製)を用い、第1表に記載した条件でゲル濾過を行った。

第1表

カラムのサイズ：2.6×90cm
ゲル充填量：480ml
流 速：24ml/40分
前分量：各6ml
洗剤液：10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)+0.5M食塩

得られた各成分について、280nmの吸光度及び

- 5 -

- 8 -

特開平 2-16994(3)

増殖阻害活性を測定した。この結果を第1図に示した。この図から明らかなように、増殖阻害因子は52~57画分(分子量約45,000)に含まれていることが分かる。

尚、増殖阻害活性は、次の方法により測定した。正常ラットの肝臓由来の上皮性細胞(BRL)を、牛胎児血清10%を添加したDMEM/F12培地を 0.5ml 含む 24穴マイクロプレートに 2.5×10^4 個/ウエルの密度で播き、給4時間後(細胞がウエルの底にこついた後)試料を20 μ l加えて、4日間培養する。この場合、試料の代わりに PBSを加えたものを対照とした。培養後、自動細胞数測定装置で細胞数を計測し、対照を 100として、これに対する細胞数で細胞増殖阻害活性を求めた。

(2) 上記で得られた52~57画分をブールし、これを 10mM トリス塩酸液(pH7.5)に対して透析した後、ヘパリン-アガロース [Heparin-agarose, バイオラッド(Bio-rad)社製] を用い、第2表に記載した条件でアフィニティクロマトグラフィーを行った。

- 7 -

第3表

カラムのサイズ: $2.6 \times 8\text{cm}$
ゲル充填量: 41ml
流速: 15ml/時間
画分量: 各 6ml
溶出液: 10mM トリス塩酸液(pH7.5);
10mM トリス塩酸液(pH7.5) + 1M 食塩;
10mM トリス塩酸液(pH7.5) + 1M 食塩
+ 6M 尿素

得られた各画分について、上記と同様に 280nm の吸光度及び増殖阻害活性を測定した。吸光度の結果を第3図に示した。増殖阻害因子は4~14画分に含まれていることが分かった。

(4) 上記で得られた4~14画分をブールし、2M の硫酸アンモニウム液とした後、25mM トリス塩酸液(pH7.5) + 2M 硫酸アンモニウムで平衡化したセファロースCL-6B (Sepharose CL-6B, ファルマシア社製) を用い、第4表に記載した条件で水素結合クロマトグラフィーを行った。

- 8 -

第2表

カラムのサイズ: $1.6 \times 6\text{cm}$
ゲル充填量: 9ml
流速: 15ml/時間
画分量: 各 6ml
溶出液: 10mM トリス塩酸液(pH7.5) + 0-0.1M 食塩及びグラジエント

得られた各画分について、上記と同様に 280nm の吸光度及び増殖阻害活性を測定した。この結果を第2図に示した。この図から明らかなように、増殖阻害因子は 60mM 食塩水抽出液画分(41~46画分)に含まれていることが分かる。

(3) 上記で得られた60mM 食塩水抽出液画分をブールし、ブルーセルロファイン [Blue-Cellulofine, テッソ(株)製] を用い、第3表に記載した条件でカラムクロマトグラフィーを行った。

- 8 -

第4表

カラムのサイズ: $2.6 \times 7\text{cm}$
ゲル充填量: 37ml
流速: 10ml/時間
画分量: 各 6ml
溶出液: 25mM トリス塩酸液(pH7.5) + 2-0.5M 硫酸アンモニウム濃度下降グラジエント

得られた各画分について、上記と同様に 280nm の吸光度及び増殖阻害活性を測定した。この結果を第4図に示した。この図から明らかなように、増殖阻害因子は 1.2M 硫酸アンモニウム溶出液画分(64~68画分)に含まれていることが分かる。

(5) 上記で得られた64~68画分をブールし、これを 10mM リン酸緩衝液(pH7.5)に対して透析し、この液について前記緩衝液で平衡化した強陰イオン交換カラム(Q4-624, 昭和電工(株)社製)を用い、第5表に記載した条件で高速液体クロマトグラフィーを行った。

- 10 -

特開平 2-16994(4)

第 5 図

カラムのサイズ: 8 x 75mm

流 速: 1.0ml/分

溶 液: 各 1ml

抽出液: 10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.5)

+ 0.1% CHAPS

+ 0~1M食塩濃度グラジエント

得られた各画分について、上記と同様に 280nm の吸光度及び増殖阻害活性を測定した。この結果を第 5 図に示した。この結果から増殖阻害因子は 45 画分に含まれていることが分かった。

物 性

上記(5)で単離した物質(増殖阻害因子)の分子量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した結果、約 45,000 であった。また、等電点電気泳動法により等電点を測定した結果、約 4.7 であった。さらに、上記物質を 0.1M 濃度の酢酸水溶液に入れ、室温で、24 時間保持し、上述した方法により増殖阻害活性を測定した結果、失活していた。また、この物質を 100℃で、5 分間加

熱し、或いは 60℃で、30 分間加熱した後、同様に増殖阻害活性を測定した結果、活性が 50% 以下に低下した。一方、この物質を 50mM のジチオスレイトールを還元剤として、還元処理を行い、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、分子量を測定した結果、約 45,000 であり、また、還元処理後の物質を上記同様に増殖阻害活性を測定した結果、活性には変化がなかった。

試験例

上記物質(増殖阻害因子)を 0.5ml の培養中に 1ng または 10ng 添加し第 5 図に得た細胞に対して用い、上述したのと同様の方法により細胞増殖阻害活性を測定した。この結果を第 5 図に示した。

この結果から明らかなように、この増殖阻害因子は種々の細胞に対し増殖阻害活性を有し、制癌剤として有用であることが分かる。

- 11 -

第 5 図

細胞の種類	細胞数 (% of control)	
	2ng/0.5ml	4ng/0.5ml
(上皮細胞)		
ラット肝細胞 (BRL)	87	15
ラット肝癌細胞 (ASV-BRL)	90	24
ヒト肝癌細胞 (A549)	100	55
ヒト扁平上皮癌細胞 (HSC-4)	88	70
ヒト肝癌細胞 (HLE)	103	68
(繊維芽細胞)		
マウス (NIH 3T3)	102	82
ヒト正常細胞 (VH-1)	110	72
ヒト癌細胞 (BS2)	94	42

(発明の効果)

以上のような本発明の細胞増殖阻害因子は、細胞増殖阻害機構を有するので新しい制癌剤として極めて有望なものである。

4. 図面の簡単な説明

- 12 -

第 1 図はセルロフライン BCL-2000a のゲル透過カラムにおける抽出物を示す図、第 2 図はヘパリン-アガロースカラムにおける抽出物を示す図、第 3 図はブルーセルロフラインカラムにおける抽出物を示す図、第 4 図はセファロース CL-6B カラムにおける抽出物を示す図、および第 5 図は Q1-824 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにおける抽出物を示す図である。

代理人 弁理士 戸 田 龍 男

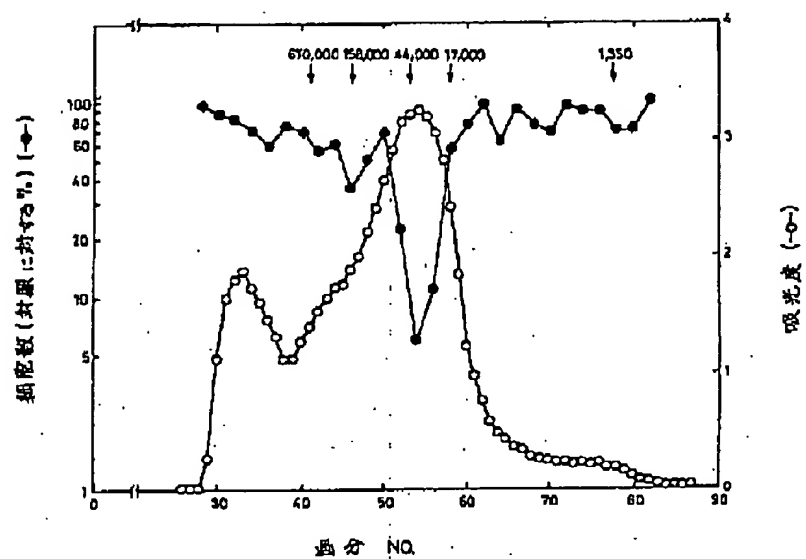
- 13 -

- 764 -

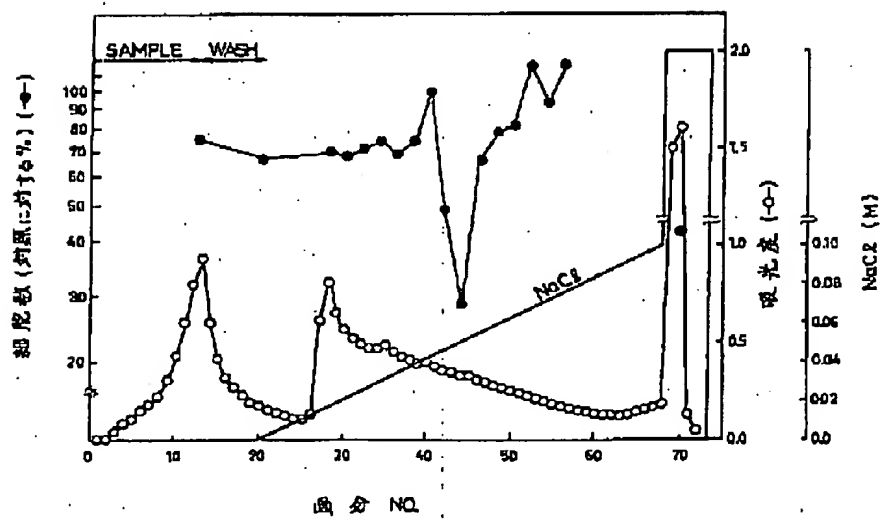
- 14 -

特開平 2-16994(5)

第 1 図

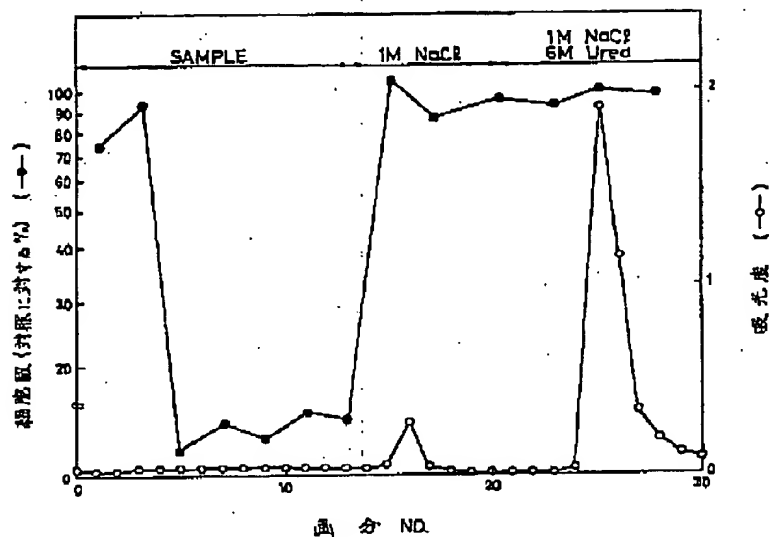


第 2 図

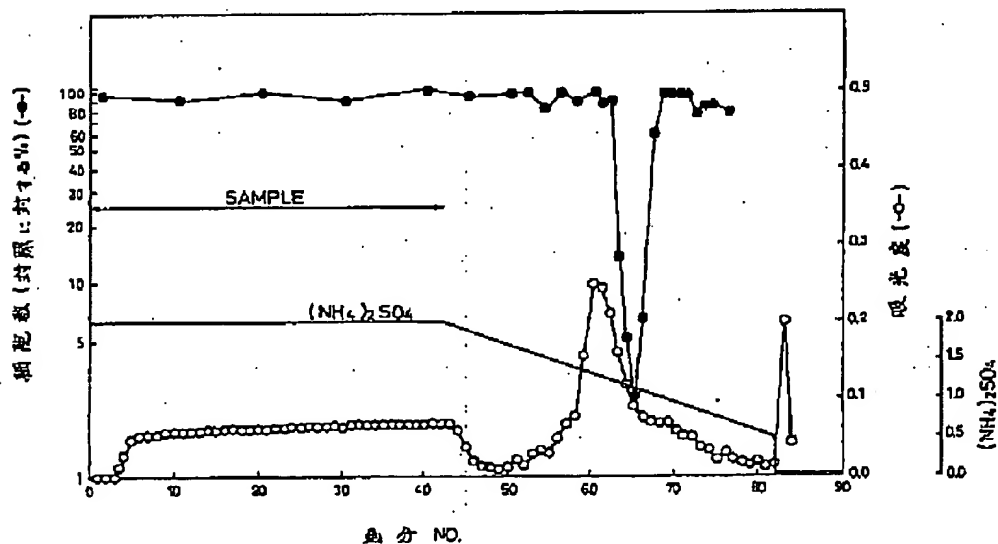


特開平 2-16994 (5)

第 3 図



第 4 図



Fulbright (NY) 様 ←S.KITAMURAPATENTOFFI 06-6375-1620

2004年 9月 28(火) 10:27 P068

特開平 2-16994(7)

第 5 図

